研究用試薬

2013 年 7 月 17 日 第 2 版

『イヌ NT-pro ANP ELISA KIT』取扱説明書

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]、並びに[Q&A]（キットの蓋を開けた際に一番上にあるカード（13×10cm）に記載されたパスワードをご利用下さい）をご参照下さい。

1.使用目的

本キットはイヌ NT-pro ANP を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。本キットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 5 時間です。
●イヌ血清（アプロチニン添加）または血漿（EDTA-アプロチニン添加）中の NT-pro ANP を測定します。
●微量な検体（標準操作法は 20μl／ウエル）で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●標準品はイヌ NT-pro ANP の合成ペプチドです。
●全ての試薬は溶液タイプです。

2.キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい（凍結厳禁）。この保存条件下でキットは製造月から 6 ヵ月（外箱のラベルに記載）までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

3.イントロダクション

NT-pro ANP は N-terminal proatrial natriuretic peptide（N-末端プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド）のことです。これは ANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド）の前駆体 pro ANP の N 末端部分のペプチドを意味します。pro ANP は心房の粗面小胞体で 149 残基の prepro ANP が合成され、ゴルジ装置で N 末端側のシグナルペプチド（23 アミノ酸）①が切り離されてアミノ酸 126 残基の pro ANP が分泌顆粒内に貯蔵され、放出直前に N 末端側アミノ酸 98 残基（NT-pro ANP）と C 末端側アミノ酸 28 残基（ANP）が 1 対 1 で切り離され放出されます。ANP はその名の通り心房から体液量の増加などによる心房の伸展、或いは心房内圧の上昇が分泌刺激となって主として冠状動脈内に分泌されます。主な標的器官は腎臓、血管で強力なナトリウム利尿作用、血管拡張、血圧下降作用を持つ環状ペプチドです。ANP は類似構造、作用を持つ BNP（Brain Natriuretic peptide）、CNP（C-type Natriuretic peptide）と共にナトリウム利尿ペプチドファミリーを形成しています。ANP は本来の受容体とクリアランス受容体に結合して循環系から急速に失われて行きますので（イヌ ANP の半減期は約 100 秒②）血中での正確な測定は困難を伴います。一方、NT-pro ANP は受容体による代謝を受けないので生物学的半減期が長く(ヒトで 60-120 分③)、測定が容易で ANP の動態を推測する良い指標となり、イヌ NT-pro ANP 測定系による心疾患検査が期待されています。

①Oikawa, S. et al. Biochem Biophys Res Commun. 132: 892-899, 1985
②Takemura, N. et al. Jpn J Vet Sci. 52: 165-166, 1990
③Mariusz, P. et al. Cellular & Molecular Biology Letters. Vol.13, 155-181, 2008

4.測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗イヌ NT-pro ANP 抗体固相化プレートウエル中でインキュベートします。2 時間のインキュベーションと洗浄後、ビオチン結合抗イヌ NT-pro ANP 抗体を加え 2 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ペルオキシダーゼ・アビジン結合物を加え、捕捉されたイヌ NT-pro ANP とともに 30 分インキュベートします。洗浄後、ウエルに残ったペルオキシダーゼを発色液（TMB）と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm（副波長 620nm）で比色測定

されます。吸光度はイヌ NT-pro ANP 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットすることで標準曲線が作られ、この標準曲線を使って未知検体中の濃度が決定されます。

5.注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●検体は感染の危険性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。本キットは動物由来の成分を含んでいます。
●使用済みの検体、使用した消耗品等は 1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
●ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
●ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温:20～25℃(実験台上またはインキュベータ内温度)を厳守して下さい。また、風速(エアコン風も含む):0.4m/sec(*①)以上、湿度30%未満の環境下での測定は避けて下さい(9.技術上のヒントをご参照下さい)。
(*①)風速 0.4m/sec の目安は弊社 Web サイトの動画「反応条件」をご参照下さい。

6. 構成品

構　成　品	状　態	容　量
(A) 抗体固相化 96 ウエルプレート	そのまま使用	96 wells(8×12)／1 枚
(B) 標準溶液(イヌ NT-pro ANP:4,000 pg/ml)	希釈後使用	100μl／1 本
(C) 緩衝液	そのまま使用	60ml／1 本
(D) ビオチン結合抗イヌ NT-pro ANP 抗体	希釈後使用	100μl／1 本
(E) ペルオキシダーゼ・アビジン結合物	希釈後使用	100μl／1 本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12ml／1 本
(H) 反応停止液(1M H_2SO_4) ※取扱注意	そのまま使用	12ml／1 本
(Ｉ) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100ml／1 本
プレートシール		4 枚
取扱説明書		1 部

7.添付されていないが必要な器具 □チェックリスト

□精製水(蒸留水) □標準溶液希釈用試験管 □洗浄液希釈用ガラス器具(メスシリンダー・ビーカー・瓶)
□チップ交換型ピペット(使い捨てチップで 50μl を正確にピペッティングできるもの、及び 200～500μl を正確にピペッティングできるもの) □連続分注ピペット(例 Eppendorf の multipette plus)、50μl を連続分注できるもの □ペーパータオル等の吸水性のあるもの(洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
□撹拌器(Vortex タイプ) □マイクロプレート振とう器(約 600～1,200 rpm)
□96 ウエルプレート用洗浄機(あれば好ましい)または噴射ビン(弊社 Web サイトの動画「洗浄操作」をご参照下さい。) □96 ウエルプレートリーダー(450 ±10 nm 、620nm:600～650nm)
□データ計算用ソフトウェア

8.試薬の調製

＊キットの試薬は使用前に必ず室温（20～25℃）に戻して下さい（2 時間位が目安です）。
＊6.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい（ご不明な際にはお問い合わせ下さい）。

【濃縮された試薬類】

［(B)標準溶液(イヌ NT-pro ANP:4,000 pg/ml)］;標準曲線作製用

（B）標準溶液イヌ NT-proANP（原液）と（C）緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。下記は一例です。

標準溶液の容量	緩衝液	濃度(pg/ml)
原液 50μl	450μl	400
400 pg/ml 溶液 200μl	200μl	200
200 pg/ml 溶液 200μl	200μl	100
100 pg/ml 溶液 200μl	200μl	50.0
50.0 pg/ml 溶液 200μl	200μl	25.0
25.0 pg/ml 溶液 200μl	200μl	12.5
0（ブランク）	200μl	0

［(D)ビオチン結合抗イヌ NT-pro ANP 抗体］

100μl を充分分取できる量をご提供しています。 **濃縮液を（C）緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**

［(E)ペルオキシダーゼ・アビジン結合物］

100μl を充分分取できる量をご提供しています。 **濃縮液を（C）緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。**

［(I)濃縮洗浄液(10×)］

濃縮洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して下さい。
例：100ml の濃縮洗浄液(10×)＋900ml の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

【試薬の安定性と保存方法】

(A)抗体固相化 96 ウエルプレート

未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(B)標準溶液(イヌ NT-pro ANP:4,000 pg/ml)

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C)緩衝液及び(F)発色液(TMB)

キットを分割して使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(D)ビオチン結合抗イヌ NT-pro ANP 抗体及び（E）ペルオキシダーゼ・アビジン結合物

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H)反応停止液(1M H_2SO_4)

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(I)濃縮洗浄液(10×)

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

9.技術上のヒント

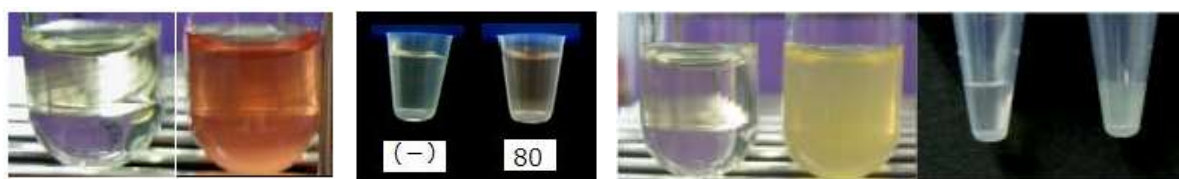
●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。
●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い青色澄明です。光を避けて保存して下さい。

●反応停止液は使用するまでは無色です。
●やむを得ず、測定操作を、風速:0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。
例)インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認下さい。

10.検体の調製

本キットはイヌ血清または血漿中の NT-pro ANP を測定します。

●検体は酵素による分解阻止対策を実施し冷蔵(2～8℃)に保ちすぐに測定するか、－35℃以下で凍結保存して下さい。凍結した検体は測定する直前に解凍し充分に撹拌して下さい。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。正しい結果が得られない原因になります。
●採血条件:EDTA・アプロチニン入り採血管の使用を推奨します(最終濃度は EDTA-2Na は 1.0～1.5mg/ml、EDTA-2K は 1.1～1.7mg/ml、アプロチニンは 100～500KIU/ml)。採血管の一例:ニプロ 31-540
●遠心分離は低温で行って下さい。
●ガラス製の試験管、ピペット等は使用しないで下さい。
●採血時の麻酔は測定値に影響を与える可能性がありますので、事前に確認して下さい。
●採血の際は血清分離促進剤・フッ素等が添加された採血管は測定系に影響を与える可能性がありますので、事前に確認して下さい。
●溶血した検体や高脂質検体は測定しないで下さい。

※血液成分の影響(高脂質・溶血等)を抑制する為に原検体中の脂質(乳ビ)・溶血が下の写真より高い場合は異常値発生の原因となる場合がありますので測定に使用しないで下さい。
本キットの場合、溶血はヘモグロビン 80mg/dL 以上で影響が現れます。

正常検体　溶血検体 80mg/dL　正常検体　溶血検体 80mg/dL　正常検体　乳ビ検体(高脂質検体)　正常検体　乳ビ検体(高脂質検体)

●濁り及び不溶物のある検体は遠心分離等で除去後測定に用いて下さい。
●妨害物質の影響が疑わしい検体は、同一検体において、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。
●検体を希釈する場合は、あらかじめ試験管(PP、PE)等を用いて緩衝液で希釈し測定ウエルに分注して下さい。**標準操作法は 2.5 倍希釈です。更に希釈が必要な際は 2.5 倍以上に希釈してご使用下さい。**
検体の希釈は用時調製して下さい。

【検体の安定性と保存方法】
検体は酵素分解阻止対策を採血時に実施して下さい。また、検体を長期に保管する場合は、−35℃以下での凍結保管を推奨します。繰り返しの凍結融解は避けて下さい。

11.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。
抗体固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

(1) 保護液を捨て、あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(2) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を 50μl ずつ分注します。
(3) 検体測定ウエルに緩衝液で希釈した希釈検体を 50μl ずつ分注します(標準操作法は 2.5 倍希釈です)。
(4) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。
(5) プレートシールを貼り(*④)、室温(20～25℃)で **2 時間**静置します。

(6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(7) 各ウエルにビオチン結合抗 NT-pro ANP 抗体を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。
(8) プレートシールを貼り(*④)、室温(20～25℃)で **2 時間**静置します。
(9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(10) 各ウエルにペルオキシダーゼ・アビジン結合物を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。
(11) プレートシールを貼り(*④)、室温(20～25℃)で **30 分間**静置します。
(12) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。
(13) 各ウエルに発色液を **50μl** ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。
(14)プレートシールを貼り(*④)、室温(20～25℃)で **30 分間**静置します。
(15)各ウエルに反応停止液を **50μl** ずつ分注し、発色反応を停止します。
(16)撹拌(*③)後マイクロプレート用分光光度計で 450nm(副波長 620nm)での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。
(＊②)、(＊③)、(＊④) 測定手順概要(7 ページ)をご参照下さい。

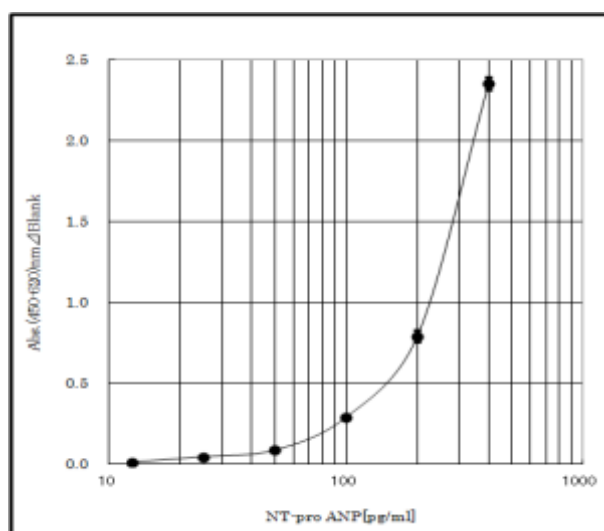
ワークシート(例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	400 pg/ml	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	200 pg/ml	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	100 pg/ml	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	50.0 pg/ml	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	25.0 pg/ml	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	12.5 pg/ml	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	ポジコン	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

12.計算

(1)測定毎に標準曲線を作製します。
片対数または両対数を使用し回帰曲線式が一番フィットする標準曲線を作製して下さい。標準曲線ついては弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照下さい。
(2)標準曲線より、希釈検体の吸光度に対応する濃度(pg/ml)を読み取ります。**読み取った濃度に検体希釈率(標準操作法では 2.5 倍)を乗じ測定値とします。**
＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は(C)緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。
＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。

イヌ NT-pro ANP 標準曲線例

＊イヌの臨床所見は臨床症状や他の検査結果などを総合的に判断して行う事が必要です。
＊プレートリーダーは Safire2(TECAN)を使用。グラフは標準曲線例です(吸光度は、測定環境により変動します)。

13.キットの性能

●測定範囲(イヌ NT-pro ANP)
12.5〜400 pg/ml(2.5 倍希釈時の実効測定範囲は 31.3〜1,000 pg/ml)の範囲で測定できます。

●交差性
ヒト ANP ・ ヒト BNP-32 ・ ヒトリコンビナント proBNP ・ ヒト CNP-22・ ヒト CNP-53 は検出限界以下。

●精度試験(アッセイ内変動)(6 重測定、2 検体)　　　　　平均 C.V.値は 5%未満

●再現性試験(アッセイ間変動)(2 重測定、3 検体、4 日間)　　平均 C.V.値は 5%未満

●添加回収試験
2 血清検体に異なる 3 濃度のイヌ NT-pro ANP を添加し測定した。回収率は 93.2%~102%でした。

●希釈直線性
2 血清検体を連続的に希釈用緩衝液で 3 段階希釈し測定した。直線回帰の R^2 は 0.9984 と 0.9998 でした。

14.参考値(イヌ NT-pro ANP)

健常犬参考値(23 頭):　平均値;73.9 pg/ml　標準偏差;22.4 pg/ml
採血条件:EDTA-2Na(最終濃度 1.0〜1.5mg/ml)とアプロチニン(最終濃度 100〜500KIU/ml)含有採血管(ニプロ製 31-540)で採血し冷蔵(4℃)で遠心後、上清の血漿を採取し、-35℃以下で保管。
飼育条件、採血条件、検体保管条件により測定値は変動します。この測定値は目安としてお使い下さい。

15.トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い
可能な解釈
1)標準品や検体の入れ忘れ。
2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3)発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4)酵素阻害剤の混入。
5)キット保管温度の影響(凍結した場合)。
6)プレートの過剰な洗浄。
7)発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度(12.5 pg/ml)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。
可能な解釈・・・　洗浄が不適当、不完全であった。
(洗浄液分注毎に、手袋した手の平でプレートを持ち 10 秒間攪拌して下さい)

●変動係数(CV)が大きい
可能な解釈
1)洗浄が不適当、不完全であった。
2)標準品や管理血清、または検体の攪拌が不充分であった(凍結検体の攪拌は充分に行って下さい)。
3)ピペッティング操作が一定ではなかった。

●Q-1　:キットは分割して使用することができますか?
A-1　:できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。

●Q-2　:プレートを取り出したらウエルの中に液体が入っていましたが何ですか?
A-2　:出荷時には保存安定液が充填してあります。

●Q-3　:検体を融かしたらモヤモヤした不溶解物がありましたが測定に影響がありますか?
A-3　:影響が出る可能性があります。測定値が低く出たり、測定下限以下になる場合があります。
特にアプロチニンを添加し抗凝固剤としてヘパリンを使用した場合、フィブリンの析出が起こる可能性があります。ヘパリンの使用濃度を濃くして頂くか、EDTA-2Na のご使用をご検討下さい。

●更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧下さい。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)] 並びに「Q&A」をご参照下さい。

☐ ウエルプレート、試薬類を充分に室温(20～25℃)に戻して下さい。**室温化には 2 時間位必要**

☐ 濃縮洗浄液の希釈 ：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

☐ 標準溶液の希釈(例)：室温化された緩衝液で、希釈して下さい。

希釈例	濃度(pg/ml)	400	200	100	50.0	25.0	12.5	0
	標準溶液(μl)	**原液：50**	200*	200*	200*	200*	200*	0
	緩衝液(μl)	450	200	200	200	200	200	200

＊：ひとつ高濃度の標準溶液

☐ ポジティブ検体の作製

☐	操作		各操作注意事項並びに関連情報
☐	**抗体固相化 96 ウエルプレート**		
☐	↓洗浄 3 回（＊②）		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**希釈検体または標準溶液**	50μl	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、2 時間反応、静置(＊④) ⇨		第一反応「反応条件」の動画参照
☐	ビオチン結合抗 イヌ NT-pro ANP 抗体の希釈 室温化された緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。		希釈溶液の調製は第一反応中に行う
☐	↓洗浄 3 回（＊②）		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**ビオチン結合抗 イヌ NT-pro ANP 抗体**	50μl	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、2 時間反応、静置(＊④) ⇨		第二反応「反応条件」の動画参照
☐	ペルオキシダーゼ・アビジン結合物の希釈 室温化された緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。		希釈溶液の調製は第二反応中に行う
☐	↓洗浄 3 回（＊②）		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
☐	**ペルオキシダーゼ・アビジン結合物**	50μl	「ピペッティング」の動画参照
☐	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、30 分間反応、静置(＊④) ⇨		第三反応「反応条件」の動画参照
☐	↓洗浄 3 回(＊②)		洗浄液除去後、直ちに発色液分注
☐	**発色液(TMB)** TMB が室温化されていることを確認	50μl	分注後、濃度により青色に変色
☐	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、30 分間反応、静置(＊④) ⇨		第四反応「反応条件」の動画参照
☐	**反応停止液(1M H_2SO_4)** 強酸性につき取扱注意	50μl	分注後、濃度により黄褐色に変色
☐	↓撹拌(＊③)		直ちに撹拌
☐	**吸光度測定(主波長 450nm、副波長 620nm:600～650nm)**		副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(＊②) **洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。** 3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300μl／ウエルです。万一、最小標準溶液濃度(12.5 pg/ml)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4～6 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5～25ml／分(ノズルの径により異なります)です。第一反応後の初回の洗浄のみウエル間のコンタミに注意して下さい。「洗浄操作」の動画をご参照

下さい。
（＊③）撹拌の目安は 600～1,200 rpm-10 秒間、3 回。「撹拌操作」の動画をご参照下さい。
（＊④）撹拌終了後プレートシールを貼り静置して下さい。「反応条件」の動画をご参照下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。プレートからシールを剥がす際はストリップが外れないように指で押さえながら剥がして下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】____________________
【所属】____________________
【測定者】__________ 【測定日】__________
【キットロット番号】__________ 【有効期限】__________
【備考】____________________

【製品名】；イヌ NT-pro ANP ELISA KIT
【コード番号】；AKDNPA-012
【英語表記】；Dog NT-pro ANP ELISA KIT (AKDNPA-012,Shibayagi Co. Ltd., Gunma,Japan)
【お問い合せ先】
製造／発売元；株式会社 シバヤギ
〒377-0007 群馬県渋川市石原 1062-1
TEL.0279-25-0279 FAX.0279-23-0313
<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp
<URL>http://www.shibayagi.co.jp